

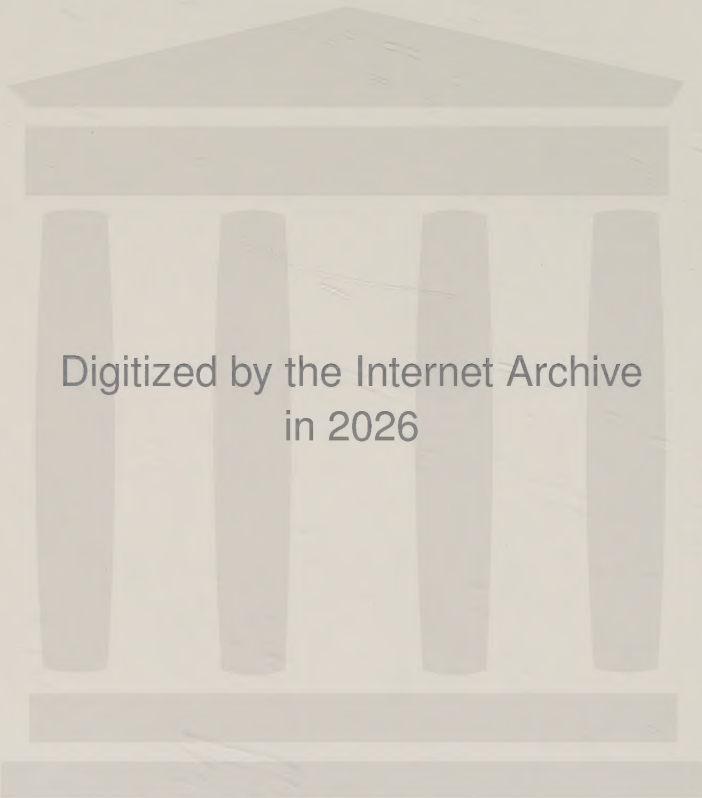
Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Penicillinasebildung bei Staphylokokken
vom Rind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Eckart Frese
Tierarzt aus Schwerin

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545905_0020

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Penicillinasebildung bei Staphylokokken
vom Rind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Eckart Frese
Tierarzt aus Schwerin

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 1970



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1,0 Einleitung	1
2,0 Literaturübersicht	3
2,1 Vorkommen penicillinresistenter Staphylokokkenstämme	3
2,2 Penicillinase	5
2,3 Nachweisverfahren	7
3,0 Material und Methoden	9
3,1 Material	9
3,11 Staphylokokken	9
3,12 Nährmedien	10
3,121 Feste Nährmedien	10
3,122 Flüssige Nährmedien	11
3,13 Indikatoren	12
3,2 Methoden	12
3,21 Durchführung der Penicillin- resistenzbestimmung	12
3,22 Aufbewahrung der resistenten Staphylokokkenstämme	14
3,23 Nachweis penicillinase-positiver Staphylokokkenstämme	14
3,24 Aufbewahrung der penicillinase- positiven Staphylokokkenstämme	15
3,25 Produktion von Penicillinase mit Penicillin	16
3,26 Anreicherung von Penicillinase	17
3,27 Regeneration der Glasperlen	17
3,28 Quantitativer Nachweis der Penicillinase	17

	Seite
3,29 Prüfung auf Konstitutivität	18
3,291 Isolierung stark penicillinase-positiver Kolonien	18
3,292 Produktion von Penicillinase ohne Penicillin	19
3,293 Anreicherung und quantitativer Nachweis	20
3,30 Prüfung penicillinempfindlicher Staphylokokken	20
3,31 Modifizierter O,3 CY-Plattentest	21
4,0 Ergebnisse	23
4,1 Penicillin-G-Resistenzbestimmung mit der Hemmhofmethode	23
4,2 Penicillinasenachweis der penicillin-resistenten Staphylokokkenkulturen	24
4,3 Quantitativer Nachweis der Penicillinasebildung	25
4,4 Konstitutivitätsnachweis	27
4,5 Untersuchung penicillinempfindlicher Staphylokokken auf Penicillinasebildung	29
4,6 Versuch zur Verbesserung der PNCB-Indikatormethode	29
4,7 Auswertung der O,3 CY-Plattenmethode	31
5,0 Diskussion	33
6,0 Zusammenfassung	37
7,0 Literaturverzeichnis	38
Lebenslauf	

1,0 Einleitung

Die durch Staphylococcus aureus hervorgerufenen Infektionen nehmen bei Mensch und Tier ständig zu. In neuerer Zeit wird mehrfach über Staphylokokkenhospitalismus (KIKUTH und GRÜN³³) berichtet, obwohl eine größere Anzahl Antibiotika gegen Staphylokokken zur Verfügung steht.

Der therapeutische Einsatz der Antibiotika führte jedoch auch zu einer zunehmenden Resistenz der Bakterien, die die Ursache für endemische Ausbreitungen besonders virulenter Staphylokokkenstämme war (GRÜN²⁵). Dieser Staphylokokkenhospitalismus blieb nicht allein auf Kliniken beschränkt, sondern erlangte auch in der Praxis bei Infektionen von Mensch und Tier große Bedeutung.

Für die Veterinärmedizin sind die Staphylokokken als Erreger von Mastitiden wichtig. LERCHE³⁹ wies bereits auf die zunehmende Häufigkeit der Staphylokokkenmastitis hin. In Deutschland sollten etwa 15 % (KIELWEIN³²) und sogar 50 % (BRODAUF¹⁰) der Milchkühe mit Staphylokokken infiziert sein. In anderen Ländern wurden zum Teil noch höhere Infektionsquoten nachgewiesen (KREBS³⁷).

Für die wirksame Bekämpfung der Staphylokokkenmastitis vom Rind stellten besonders die penicillinresistenten Stämme ein großes Problem dar. Die Resistenz gegen Penicillin bei S. aureus wird durch

mehrere Faktoren bedingt. Einer der wichtigsten davon ist die Bildung der Penicillinase, eines penicillinabbauenden Enzyms (HAWKER et al.²⁷).

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, an einer möglichst großen Anzahl von Staphylokokkenstämmen vom Rind die Resistenz gegen Penicillin und die Bildung von Penicillinase zu ermitteln sowie die Induzierbarkeit dieses Enzyms auf halbquantitativem Wege zu prüfen.

2,0 Literaturübersicht

2,1 Vorkommen penicillinresistenter Staphylokokkenstämme

Penicillin, von Alexander Fleming entdeckt, wurde bereits 1929 bei Wundinfektionen therapeutisch angewandt (zit. nach DITTUS¹⁴). Es geriet aber bald in Vergessenheit und erst mit Ausbruch des 2. Weltkrieges und dem Bedarf an neuen Wundheilmitteln gewann das Penicillin wieder Bedeutung. Es wurde von Florey, Abraham und Chain in kristalliner Form dargestellt und der Therapie zugänglich gemacht (zit. nach REHM⁵¹). Im Jahre 1944 wurde es schon in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung des Gelben Galtes (Euterinfektion durch Streptococcus agalactiae) eingesetzt.

Im Laufe der Jahre wurde Penicillin gegen die Staphylokokkeninfektionen bei Mensch und Tier in zunehmendem Maße verwendet. Eine Begleiterscheinung dieser Antibiotikatherapie war das gehäufte Vorkommen penicillinresistenter Staphylokokken.

Über die Entstehung der Penicillinresistenz gab es verschiedene Vorstellungen. Nach MEYER⁴² sollten penicillinresistente Staphylokokken bereits in den Ausgangsstämmen vorhanden sein, die durch das Penicillin herausselektiert werden; oder es sollten penicillinresistente Mutanten entstehen, die ebenfalls durch das Penicillin herausgezüchtet werden; oder es sollte eine

Adaptation der Staphylokokken an das Penicillin unter Umstellung ihrer Stoffwechselleistungen stattfinden. BARBER⁴ differenzierte Staphylokokken je nach Art ihrer Reaktion gegenüber Penicillin in tolerante, abhängige und abbauende Stämme. Bakterien der penicillintoleranten Gruppe wuchsen bei zunehmenden Penicillinkonzentrationen. Das Wachstum der penicillinabhängigen Stämme wurde in Abhängigkeit zum Antibiotikum begünstigt. Penicillinabbauende Staphylokokken produzierten eine Substanz, die Penicillin inaktivierte.

Bald nach der Einführung der Penicillintherapie machte sich das Problem der Penicillinresistenz bemerkbar. Resistenzuntersuchungen an euterpathogenen Staphylokokken wurden bereits 1945 durchgeführt (MURNANE⁴³).

Eine Vielzahl zum Teil unterschiedlicher Ergebnisse wurde über antibiotische Resistenzprüfungen veröffentlicht. Diese wurden mit verschiedenen Methoden und Antibiotikakonzentrationen ermittelt. Unter Staphylokokken vom Menschen waren penicillinresistente Stämme stark verbreitet (GRÜN²⁵, HEPBURN²⁸, PULVERER, SCZUKA und PILLICH⁵⁰). In der Veterinärmedizin wurden zunächst relativ selten resistente Stämme angetroffen. In den Untersuchungen von SETO und WILSON⁵⁴ waren nur 5 (4,2 %) von 119 Rinderstämmen penicillinresistent. HØGH²⁹ untersuchte 674 Staphylokokkenkulturen, von denen 77 (11,4 %) Resistenz aufwiesen. Eine umfassende

Zusammenstellung der Ergebnisse bisheriger Resistenzuntersuchungen an euterpathogenen Staphylokokken wurde von DITTUS¹⁴ veröffentlicht.

2,2 Penicillinase

ABRAHAM und CHAIN¹ isolierten ein penicillinabbauendes Enzym aus "Bacterium coli". Sie nannten es Penicillinase. KIRBY³⁴ extrahierte aus 7 Staphylokokkenstämmen einen "Penicillininaktivator". Ebenso konnten BONDI und DIETZ⁸ bei 16 und GOTS²⁴ bei 53 untersuchten penicillinresistenten Staphylokokkenstämmen einen "Penicillininaktivator" feststellen. Die Eigenschaft des isolierten "Penicillininaktivators" von Staphylokokken wurde von KIRBY³⁵ eingehend untersucht. Er extrahierte den "Inaktivator" mit derselben Aceton-Äther-Methode, die vorher von HARPER²⁶ zur Gewinnung zellfreier Penicillinase von "Paracolon-Bazillen" angewandt worden war. Das gewonnene Produkt verglich KIRBY mit dem von ABRAHAM und CHAIN¹ isolierten penicillinabbauenden Enzym und konnte keinen wesentlichen Unterschied feststellen.

SPINK und FERRIS⁵⁵, GILSON und PARKER²² und CZEKALOWSKI¹² stimmten mit KIRBY³⁵ über die intrazelluläre Lokalisation der Staphylokokkenpenicillinase überein. Dagegen konnten HOUSEWRIGHT und HENRY³⁰ von einem Staphylokokkenstamm zellfreie Penicillinase isolieren. GOTS²⁴ und LURIA⁴⁰ wiesen in Überständen penicillinresistenter Staphylokokken-

kulturen Penicillinaseaktivität nach. ERIKSEN und HANSEN¹⁶ berichteten ebenfalls von der Produktion extrazellulärer Penicillinase bei Staphylokokken.

Die Penicillinresistenz der Staphylokokken schien beinahe ausschließlich durch die Penicillinaseproduktion der Stämme bedingt zu sein (KIRBY³⁴, SPINK, HALL und FERRIS⁵⁶, BONDI und DIETZ⁸, GOTS²⁴, BARBER und ROZWADOWSKA-DOWZENKO⁵, MARTYN⁴¹, FORBES¹⁸, BARBER und WHITEHEAD⁶). Weiterhin berichteten LURIA⁴⁰, BARBER³, GILSON und PARKER²², BONDI und DIETZ⁸ und BARBER und WHITEHEAD⁶, daß der Grad der Penicillinresistenz von der Menge der produzierten Penicillinase abhängig war. Wachstum der Staphylokokken bei 44°C beschleunigte den Verlust der Penicillinasebildung. Es entstanden wieder penicillinempfindliche Varianten (BONDI, KORNBLUM und PHALLE⁹, FAIRBROTHER, PARKER und EATON¹⁷).

MOREOVER, BELLAMY und KLIMECK (zit. nach GERONIMUS und COHEN²¹) berichteten, daß Penicillinase bei einem Stamm induziert werden konnte. DUTHIE¹⁵ und POLLOCK⁴⁸ beobachteten induzierbare Penicillinase bei Bacillus cereus. GERONIMUS und COHEN²¹ konnten bei 13 penicillinresistenten koagulase-positiven Staphylokokkenstämmen eine zunehmende Penicillinaseproduktion durch Schütteln mit Penicillin ermitteln. Unter denselben Bedingungen konnten sie bei 7 penicillinempfindlichen Stämmen keine Penicillinaseaktivität nachweisen. Sie

folgerten, daß Staphylokokkenpenicillinase ein induzierbares Enzym sei.

2,3 Nachweisverfahren

Die Inaktivierung von Penicillin durch Penicillinase war durch die Bildung von antibiotisch inaktiver Penicilloinsäure bedingt (ABRAHAM et al.²). Zahlreiche jodometrische Verfahren, die auf der Reaktion überschüssigen Jods mit der enzymatisch gebildeten Penicilloinsäure beruhten, wurden zum Nachweis von Penicillinase verwendet. PERRET⁴⁷ beschrieb eine relativ zuverlässige und schnell durchführbare jodometrische Methode, Penicillinaseaktivität nachzuweisen. Für Reihenuntersuchungen wurde diese Methode von CSÁNYI¹¹ modifiziert. Bei beiden Nachweisverfahren wurde Jod mit Thiosulfat bestimmt. GOODALL und DAVIES²³ wiesen die Penicilloinsäure photometrisch nach und NOVICK⁴⁴ entwickelte eine mikrojodometrische Methode zur Bestimmung der Hydrolyse von Penicillin zur Penicilloinsäure. Seine Mikromethode war tausendmal empfindlicher als die bis dahin existierenden chemischen Verfahren. Er wies aber auch auf die Fehlerquellen bei der Entfärbung des Jodstärkekomplexes hin.

Um Penicillinase direkt im Kulturmedium nachzuweisen, mußten andere Verfahren entwickelt werden. Jodometrische Methoden waren unbrauchbar, da das Jod bereits mit den reduzierenden Bestandteilen des Kulturmediums reagierte. So bestimmten KOGHUT,

POLLOCK und TRIDGELL³⁶ Penicillinase von B. cereus durch Adsorption an Glasperlen. Die Adsorption der Penicillinase von S. aureus an Glasperlen wurde dann von RICHMOND⁵² beschrieben. Sie war weniger wirksam als die entsprechende Adsorption der Penicillinase von B. cereus. Es wurde aber auch im Falle der Staphylokokkenpenicillinase eine selektive Anreicherung aus dem Kulturmedium erreicht.

Ein Verfahren zur exakten Messung des Enzyms wurde von ZYK und CITRI⁵⁹ entwickelt. Sie bestimmten die Penicillinase mit Hilfe der automatischen Titration. Diese Methode wurde von SCHAEF und BLOBEL⁵³ modifiziert und kam für den direkten Nachweis der Staphylokokkenpenicillinase im Kulturmedium zur Anwendung. Es konnte die Enzymaktivität in Einheiten gemessen werden, wobei eine Einheit Penicillinase dem Verbrauch von 1 μ M Penicillin bzw. 1 μ M KOH pro Stunde bei 25°C entsprach.

Für die qualitative Bestimmung der Penicillinase auf Agarplatten beschrieb NOVICK⁴⁵ ein Testmedium, welches für den Enzymnachweis mit PNCB (N-Phenyl- α -Naphthyl-Aminoazobenzol-o-Carbonsäure)-Indikatorlösung behandelt wurde. Ein von NOVICK und RICHMOND⁴⁶ modifiziertes Verfahren, das bei den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurde, führte zum selektiven Nachweis penicillinase-positiver Staphylokokken auf Agarplatten.

3,0 Material und Methoden

3,1 Material

3,11 Staphylokokken

Als Untersuchungsmaterial dienten 1251 Staphylokokkenkulturen vom Rind (Tabelle I). Alle Kulturen wurden aus Milchproben von Kühen mit oder ohne Sekretionsstörungen isoliert.

Tabelle I
Herkunft der Staphylokokkenkulturen

Herkunft	Zahl der Staph.-Kulturen
Staatl. Tierärztliches Untersuchungsamt, Aulendorf	24
Institut für Milch- hygiene der Bundesan- stalt für Milchforschung, Kiel	1217
Praktische Tierärzte	10

3,12 Nährmedien

3,121 Feste Nährmedien

3,1211 Zur Züchtung von Staphylokokken dienten Blutagarplatten. Das verwendete Agarmedium enthielt 0,1 % Pepton⁽¹⁾, 0,5 % Fleischextrakt nach LIEBIG⁽²⁾, 0,2 % Natriumdiphosphat, 0,3 % Natriumchlorid und 2 % Agar⁽³⁾. Dem nach dem Autoklavieren noch flüssigen Medium wurden bei 52°C defibriertes Schafblut im Verhältnis 9 : 1 hinzugefügt.

3,1212 Zur Aufbewahrung von Staphylokokken wurde Blutschrägagar obiger Zusammensetzung mit 50 µg/ml Penicillin-G verwendet.

3,1213 Zur Penicillinresistenzbestimmung von Staphylokokken wurde derselbe Blutagar wie zur Züchtung der Staphylokokken hergestellt und in Petrischalen ausgegossen. Für den Resistenztest wurden Penicillin-G-Testtabletten⁽⁴⁾ mit 1,5 IE verwendet.

(1) E. Merck AG, Darmstadt

(2) Compagnie Liebig-Antwerpen

(3) Difco Laboratories, Detroit, USA

(4) Bayer, Leverkusen

3,1214 Penicillinasetestmedium zum Nachweis der Penicillinasebildung einzelner Kulturen war der 0,3 CY-Agar von NOVICK⁴⁵, bestehend aus 0,3 % Hefeextrakt⁽¹⁾, 1,5 % Agar⁽²⁾ und 0,001 M $MgSO_4$. Dazu wurden pro 1 0,2 ml einer wäßrigen Lösung von 0,5 % $CuSO_4$, 0,5 % $ZnSO_4$, 0,5 % $FeSO_4$, 0,2 % $MnCl_2$ mit 10 % HCl hinzugefügt. Nach Einstellen von pH 7,6 und Autoklavieren bei 121°C und 1,1 atü Druck für 15 Minuten wurde das Medium in Petrischalen von 9 cm Durchmesser in einer Schichthöhe von etwa 2 mm ausgegossen.

3,122 Flüssige Nährmedien

3,1221 Die Staphylokokken wurden zur Bestimmung der Penicillinresistenz in "Trypticase-Soy-Broth" (TSB)⁽²⁾ bebrütet. Die Bouillon wurde nach den Angaben der Herstellerfirma zubereitet, zu jeweils 4,5 ml in Reagenzgläser abgefüllt und 15 Minuten bei 121°C und 1,1 atü Druck autoklaviert.

3,1222 Zur Produktion der Penicillinase wurden die Staphylokokken in LO_3 -Medium⁵⁷ ohne Na-Lactat gezüchtet. Dem Medium wurde eine separat autoklavierte 50%ige Maltoselösung⁽¹⁾ bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt³¹.

(1) E. Merck AG, Darmstadt

(2) Difco Laboratories, Detroit, USA

3,13 Indikatoren

3,131 Zur Selektion einzelner penicillinase-positiver Kolonien wurden 0,3 CY-Platten mit einem Indikator nach NOVICK und RICHMOND⁴⁶ behandelt. Der Indikator war eine 0,25%ige Lösung von N-Phenyl- α -Naphthyl-Aminoazobenzol-o-Carbonsäure (PNCB⁽¹⁾) in N,N-Dimethylformamid⁽²⁾ mit 6 % 1 N NaOH.

3,132 Für die photometrische Messung der Penicillinaseaktivität kam eine Jodstärke-
lösung zur Anwendung. Diese wurde hergestellt aus 1 ml einer 10^{-2} M Jodlösung in 2 % KJ und 1 ml einer 1%igen Stärkelösung aufgefüllt mit 0,02 M Na_2HPO_4 (pH 7) auf 100 ml.

3,2 Methoden

3,21 Durchführung der Penicillinresistenzbestimmung

Nach 24stündiger Bebrütung der Staphylokokkenkulturen bei 37°C auf Schafblutagarplatten wurde eine repräsentative Kolonie mit einer Öse abgeimpft und in 4,5 ml TSB-Bouillon suspendiert. Nach 12stündiger Bebrütung wurde eine volle Öse dieser Suspension auf Schafblutagarplatten gebracht und mit einem sterilen Glasspatel auf der

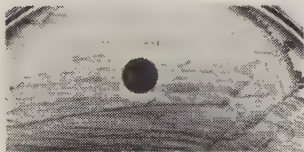
(1) K & K Laboratories, Hollywood, USA

(2) E. Merck AG, Darmstadt

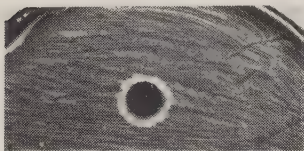
Agaroberfläche gleichmäßig ausgestrichen. Anschließend wurden Penicillin-G-Testtabletten mit einer sterilen Pinzette auf die inokulierten Platten gelegt und leicht angedrückt. Die Platten wurden zunächst 1 Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und danach 12 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die einzelnen Stämme wurden je nach Breite der Hemmzone ausgewertet (Abb. 1).

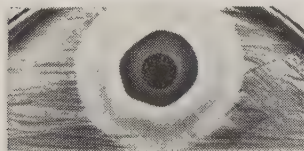
Abb. 1: Penicillin-G-Resistenzbestimmung



"Vollresistenter" Stamm
(ohne Hemmhof)



"Teilresistenter" Stamm
(mit einer Hemmzonenbreite⁺
bis 3 mm)



Empfindlicher Stamm
(mit einer Hemmzonenbreite⁺
von über 3 mm)

⁺ gemessen vom Rande der Testtablette bis
zum Rande des Hemmhofes

3,22 Aufbewahrung der resistenten Staphylokokkenstämme

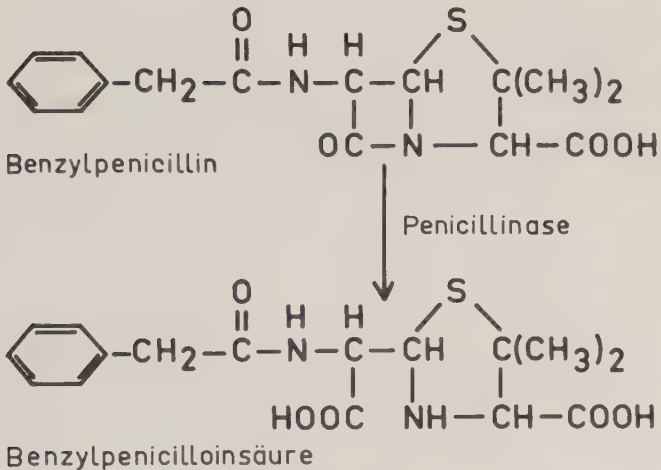
Zur Aufbewahrung der resistenten Stämme wurden aus der nächsten Umgebung der Testta-
bletten mit einer Öse Staphylokokken abgeimpft
und auf Penicillin-G enthaltenden Blutschräg-
agar überimpft. Nach 24stündiger Bebrütung bei
37°C wurden die Schrägagarkulturen bei 4°C auf-
bewahrt. Erneute Überimpfungen erfolgten in
Abständen von 4 Wochen.

3,23 Nachweis penicillinase-positiver Staphylokokken- stämme

Von dem Penicillin-G enthaltenden Blutschräg-
agar wurden die resistenten Staphylokokkenkulturen
mit einer Öse auf die 0,3 CY-Platten überimpft.
Dabei konnten bis zu 4 Kulturen auf die Peni-
cillinase-Testplatten ausgestrichen werden. Nach
48stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Petri-
schalen geöffnet und das beimpfte Testmedium im
Brutschrank bei 37°C 2 Stunden getrocknet. An-
schließend wurde auf die Agaroberfläche pro Platte
1,5 ml der PNCB-Indikatorlösung pipettiert. Die
Lösung wurde durch Schwenken der Petrischalen
gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Die Petri-
schalen wurden bis zum vollständigen Eintrocknen
der Indikatorlösung offengehalten. Um penicilli-
nase-positive Kolonien erkennen zu können, wurde
anschließend 1,5 ml einer wäßrigen 10%igen Peni-
cillin-G-Lösung auf die Platten gegeben (NOVICK

und RICHMOND⁴⁶). Bei positiver Reaktion erfolgte eine Hydrolyse des Penicillins zur Penicilloinsäure (Abb. 2). Der durch die gebildete Penicilloinsäure verursachte Farbumschlag des Indikators von gelb nach blaurot zeigte somit einen penicillinase-positiven Staphylokokkenstamm an.

Abb. 2: Spaltung von Penicillin durch Penicillinase und Bildung der Penicilloinsäure



3,24 Aufbewahrung der penicillinase-positiven Staphylokokkenstämme

Für die Penicillinaseproduktion wurden von der penicillinase-positiven Staphylokokkenkultur die

am stärksten blaurot gefärbten Kolonien abgeimpft und auf Penicillin-G enthaltenden Blutschrägagar ausgestrichen. Die Überimpfung mußte innerhalb 6 Stunden nach dem Aufschwemmen des PNCB-Indikators erfolgen, da die Staphylokokkenkulturen sonst auf dem Blutschrägagar nicht anwuchsen. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Schrägagarkulturen zuparaffiniert und bei 4°C aufbewahrt. Zur Erhaltung der Penicillinaseaktivität wurden die Kulturen im Abstand von 4 Wochen überimpft.

3,25 Produktion von Penicillinase mit Penicillin

Zur Produktion⁵³ von Penicillinase wurde LO_3 -Medium ohne Na-Lactat verwendet. Als Kohlenstoffquelle diente eine 50%ige Maltoselösung. Vom Blutschrägagar wurde die Kultur abgeimpft und in einen 100 ml-Kolben mit 10 ml LO_3 -Medium und 0,1 ml 50%iger Maltoselösung suspendiert. Nach 14stündiger Bebrütung bei 37°C und 60 U/Min.⁽¹⁾ wurden 2 ml dieser Vorkultur in 1 l-Kulturkolben mit 100 ml LO_3 -Medium und 1 ml 50%iger Maltoselösung pipettiert. Nach 3stündiger Bebrütung bei 37°C und 60 U/Min. wurden je 400 mg⁷ Penicillin-G zugegeben. Nach einer weiteren Bebrütung von 5 Stunden unter denselben Bedingungen wurden die Kulturen bei 24000 x g 20 Minuten zentrifugiert⁽²⁾.

(1) Rundschüttelmaschine, Modell RC4, A. Kühner, Basel
(2) Sorvall-RC2-B-Zentrifuge, Sorvall-Wissenschaftliche Apparate, Heidelberg

3,26 Anreicherung von Penicillinase

Nach dem Zentrifugieren wurden die 100 ml Kulturüberstand mit 20 g Glasperlen⁽¹⁾ (etwa 0,1 mm Ø) bei 4°C 3 Stunden magnetisch gerührt und der Kulturüberstand vorsichtig abgegossen. Nach zweimaligem Waschen der Glasperlen mit dest. H₂O wurden diese in ein Chromatographierohr von 17 mm Ø mit einer G3-Fritte eingespült. Die Glasperlen sedimentierten und das überstehende Wasser wurde vorsichtig abgegossen. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml dest. H₂O durchgespült und nach Eindringen des Wassers mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung (pH 7,8) eluiert. Das Eluat wurde in 5 Fraktionen von ca. 2 ml aufgefangen.

3,27 Regeneration der Glasperlen

Nach der Elution wurden die Glasperlen mit Wasser in ein Becherglas gespült und 30 Minuten in einer 6%igen Natronlauge magnetisch gerührt. Anschließend wurden die Glasperlen auf einem Filtertrichter mit dest. H₂O gründlich gewaschen. Nach dem Trockensaugen wurden die Glasperlen 3 Stunden bei 130°C getrocknet.

3,28 Quantitativer Nachweis der Penicillinase

Für die Selektion der penicillinase-positiven Staphylokokkenstämme wurden 0,1 ml einer 0,1%igen

(1) Braun, Melsungen

Penicillin-G-Lösung in dest. H_2O und 3 ml einer auf $30^{\circ}C$ temperierten Jodstärkelösung in eine Küvette von 1 cm Schichtlänge einpipettiert und dann 0,1 ml der eluierten Fraktionen mit einer Mikroliterpipette Marburg⁽¹⁾ zugefügt. Diese Mischung wurde nach dreimaligem Schütteln sofort bei 578 nm⁽²⁾ photometriert. Nachdem der Lichtzeiger des Photometers 0,03 Extinktionseinheiten durchwandert hatte, wurde die benötigte Zeit für eine Extinktionsdifferenz von 0,3 gestoppt. Die dazu benötigte Zeit war der Penicillinaseaktivität eines Staphylokokkenstammes umgekehrt proportional. Die blaue Reaktionslösung wurde bei zunehmender Aktivität entsprechend schneller entfärbt. Die Reaktion beruhte auf einer Bindung des Jods mit der enzymatisch gebildeten Penicilloinsäure.

3,29 Prüfung auf Konstitutivität

Zur Selektion stark penicillinase-positiver Staphylokokkenkolonien kam das Lederberg-Verfahren³⁸ zur Anwendung.

3,291 Isolierung stark penicillinase-positiver Kolonien

Die stark induzierbaren Staphylokokkenstämme wurden mit einer Öse vom Blutschräg-

(1) Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GMBH, Hamburg

(2) Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz GMBH, Hamburg

agar abgeimpft und in 4,5 ml TSB-Bouillon suspendiert. Nach 6stündiger Bebrütung bei 37°C wurden 2 ml der Staphylokokken-TSB-Bouillonkultur in 18 ml 0,87%iger NaCl-Lösung pipettiert und anschließend 5 Sekunden mit Ultraschall⁽¹⁾ von 20000 Hz bestrahlt. Die beschallte Suspension wurde mit 0,87%iger NaCl-Lösung bis zu einer Verdünnung von 10⁻¹⁰ weiterverdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 0,1 ml auf Schafblutagarplatten ausgestrichen. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Platten mit einer Keimzahl von ca. 15 - 20 Keimen mit dem Lederberg-Stempel auf je 3 - 4 0,3 CY-Platten überimpft. Die 0,3 CY-Platten wurden nach 48stündiger Bebrütung bei 37°C, wie bereits beschrieben, zum Penicillinase-nachweis mit PNCB-Indikatorlösung und einer 10%igen wäßrigen Penicillin-G-Lösung behandelt.

3,292 Produktion von Penicillinase ohne Penicillin

Hierfür wurden die auf den 0,3 CY-Platten am stärksten blaurot gefärbten Kolonien jeweils in einen 100 ml-Kolben mit 10 ml LO₃-Medium und 0,1 ml 50%iger Maltoselösung suspendiert. Nach 14stündiger Bebrütung bei 37°C und 60 U/Min. wurden von dieser LO₃-Kultur 2 ml in 1 l-Kolben mit 100 ml LO₃-Medium und 1 ml 50%iger Maltose-

(1) Sonifier Typ S 125, Branson Sonic Power,
Danbury, Connecticut, USA

lösung pipettiert und nach 8stündiger Bebrütung bei 37°C und 60 U/Min. zentrifugiert.

3,293 Anreicherung und quantitativer Nachweis

Der Kulturüberstand wurde mit 20 g Glasperlen 3 Stunden bei 4°C magnetisch gerührt. Anreicherung und quantitativer Nachweis wurden nach dem gleichen Verfahren wie bei der Induzierung der Staphylokokkenstämme durchgeführt.

3,30 Prüfung penicillinempfindlicher Staphylokokken

Zum Nachweis penicillinempfindlicher Staphylokokkenstämme auf Penicillinasebildung wurde ein automatischer Titrator⁽¹⁾ benutzt. Hierfür wurde von der Penicillinresistenz-Bestimmungsplatte von einem penicillinempfindlichen Staphylokokkenstamm eine Öse voll in 10 ml LO_3 -Medium mit 0,1 ml 50%iger Maltoselösung suspendiert. Nach 14stündiger Bebrütung bei 37°C und 60 U/Min. wurde die LO_3 -Kultursuspension bei 24000 x g 20 Minuten zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde vor der exakten Messung⁵³ im automatischen Titrator in einen Dialysierschlauch⁽²⁾ von 2,4 cm Ø gefüllt und gegen 0,87%ige NaCl-Lösung bei 4°C über Nacht dialysiert, um niedermolekulare Bestandteile, wie

(1) pH Meter 25, Titrator TTT 11, Titrigraph SBR2c und Motorbürette ABU 1; Radiometer, Kopenhagen

(2) Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich

Aminosäuren, aus dem Kulturüberstand weitgehend zu entfernen. Zur Messung wurden 2 ml des dialysierten Kulturüberstandes im Titrator auf pH 7 gebracht. Anschließend wurden 2 mg Penicillin-G hinzugefügt. Die Messung erfolgte mit einer Bürette von 0,25 ml und einer Registrierbreite von 25 cm. Dabei wurde der Verbrauch von genau 0,05 ml $4 \times 10^{-2} \text{M}$ KOH ($= 2 \mu\text{M}$) registriert. Die Titration erfolgte bei einem Proportionalband von 1 und einer Zeitkonstanten von 480 Sekunden.

3,31 Modifizierter 0,3 CY-Plattentest

Stark penicillinase-positive Staphylokokkenkulturen wurden vom Blutschrägagar auf je 4 0,3 CY-Platten überimpft. Nach 48stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Kulturplatten geöffnet und 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die auf die Agaroberfläche pipettierten 1,5 ml der PNCB-Indikatorlösung nach folgenden Zeitabständen abgegossen (Tabelle II). Nach vollständigem Eintrocknen der noch vorhandenen PNCB-Indikatorlösung wurden 1,5 ml einer wäßrigen 10%igen Penicillin-G-Lösung gleichmäßig auf die Agaroberfläche verteilt. Die am stärksten blaurot gefärbten Kolonien auf den 4 unterschiedlich behandelten 0,3 CY-Platten wurden getrennt nach der gleichen Methode wie die induzierbaren Staphylokokkenstämme auf ihre Penicillinaseaktivität untersucht.

Tabelle II
Einwirkungszeiten der PNCB-Indikatorlösung
auf die inokulierten 0,3 CY-Platten

0,3 CY-Platten	Abgießen der PNCB- Indikatorlösung nach
1. Platte	-
2. Platte	10 Sek.
3. Platte	1 Min.
4. Platte	5 Min.

4,0 Ergebnisse

4,1 Penicillin-G-Resistenzbestimmung mit der Hemmhofmethode

Die Testtabletten wurden nach dem Auflegen angedrückt, um eine gute Haftung der penicillinhaltigen Tabletten auf dem Agar und eine optimale Diffusion des Wirkstoffes in den Nährboden zu gewährleisten. Die Breite des Hemmhofes (Abb. 1) war die Grundlage für die Auswertung.

Von den 1251 untersuchten Staphylokokkenkulturen vom Rind waren 686 (54,8 %) penicillinresistent. Der Anteil der "vollresistenten" Kulturen betrug 28,5 %, der Anteil der "teilresistenten" Kulturen 26,3 % (Tabelle III).

Tabelle III
Ergebnis der Penicillin-G-Resistenzbestimmung

Anzahl der untersuchten Staph.-Kulturen	1251
"Vollresistente" ⁺ Staph.-Kulturen	357 (28,5 %)
"Teilresistente" ⁺ Staph.-Kulturen	329 (26,3 %)
Empfindliche ⁺ Staph.-Kulturen	565 (45,2 %)

⁺ siehe Abb. 1

4,2 Penicillinasenachweis der penicillinresistenten Staphylokokkenkulturen

Die Prüfung der penicillinresistenten Staphylokokkenkulturen auf Penicillinasebildung erfolgte mit dem 0,3 CY-Plattentest. Hierbei kam es darauf an, daß, bevor die 1,5 ml 10%ige wäßrige Penicillin-G-Lösung auf die Agaroberfläche gleichmäßig verteilt wurde, die PNCB-Indikatorlösung vollständig eingetrocknet war. Die stark penicillinase-positiven Kolonien verfärbten sich innerhalb kurzer Zeit von gelb nach blaurot. Bei weniger stark penicillinase-positiven Kolonien dauerte der Farbumschlag entsprechend länger. Das Ablesen der Reaktion erfolgte innerhalb 1 Stunde. Insgesamt waren von den 686 penicillinresistenten Staphylokokkenkulturen 419 (61,1 %) penicillinase-positiv. Dabei ergab sich, daß die "vollresistenten" Stämme etwa denselben Anteil penicillinase-positiver Kulturen aufwiesen wie die "teilresistenten" Stämme. Die prozentuale Verteilung ist aus Tabelle IV zu ersehen.

Tabelle IV

Nachweis penicillinase-positiver Staphylokokkenkulturen

Verteilung der Penicillin-G-Resistenz		Penicillinase-positive Kulturen
"Vollresistente" Staph.-Kulturen	357	235 (65,8 %)
"Teilresistente" Staph.-Kulturen	329	184 (55,9 %)
Insgesamt	686	419 (61,1 %)

4,3 Quantitativer Nachweis der Penicillinasebildung

Um die ermittelten penicillinase-positiven Stämme auf ihre Penicillinaseaktivität zu untersuchen, wurden die Kulturen während der Produktion mit Penicillin-G in einer Dosis von 400 mg/l Kulturmedium induziert. Nach der Anreicherung mit Hilfe von Glasperlen und anschließender Elution durch halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung wurden die einzelnen Fraktionen mit dem Photometer auf ihre Aktivität geprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die höchste Penicillinaseaktivität stets im zweiten Fraktionsröhrchen, in dem auch eine erste Schlierenbildung beim Auffangen des Eluats auftrat, gemessen wurde. Das Ergebnis der Messung resultierte aus der benötigten Zeit, in

der der Zeiger des Photometers bei 578 nm 0,3 Extinktionseinheiten durchlief. Es wurde zwischen stark, mittelstark und schwach induzierbaren Stämmen differenziert. Bei stark induzierbaren Stämmen durchlief der Zeiger in weniger als 20 Sekunden, bei mittelstark induzierbaren zwischen 20 und 50 Sekunden und bei schwach induzierbaren in mehr als 50 Sekunden die 0,3 Extinktionseinheiten. Außerdem wurde bei der Messung zwischen "vollresistenten" und "teilresistenten" penicillinase-positiven Staphylokokkenstämmen unterschieden (Tabelle V).

Tabelle V
Verteilung der induzierbaren
Staphylokokkenstämmen

Induzierbarkeit	"Vollresistente" Staph.-Stämme	"Teilresistente" Staph.-Stämme
stark induzierbar (bis 20 Sek.)	21 (8,9 %)	11 (6,0 %)
mittelstark induzierbar (20 - 50 Sek.)	76 (32,3 %)	40 (21,2 %)
schwach induzierbar (über 50 Sek.)	138 (58,7 %)	133 (72,3 %)

4,4 Konstitutivitätsnachweis

Von den insgesamt 32 stark induzierbaren Staphylokokkenstämmen wurden 10 auf Konstitutivität geprüft. Hierfür wurden die am stärksten penicillinase-positiven Staphylokokkenkolonien selektioniert. Durch die PNCB-Indikatormethode auf 0,3 CY-Platten wurden die Kolonien ermittelt, welche durch Farbumschlag von gelb nach blaurot die höchste Aktivität vermuten ließen.

Durch Kultivierung ohne Zusatz von Penicillin-G sollte geprüft werden, ob die Staphylokokken auch ohne Induktion Penicillinase bilden und welche Aktivitäten dabei auftraten. Die Angaben in Tabelle VI bezogen sich auf die Messung der zweiten Fraktionsröhrchen, welche die höchsten Penicillinaseaktivitäten aufwiesen. Gleichzeitig wurden die jeweiligen Kulturen der einzelnen Kolonien mit Penicillin-G induziert und die Ergebnisse dieser Aktivitäten den Ergebnissen der konstitutiv gebildeten Penicillinaseaktivitäten gegenübergestellt. Dabei konnte festgestellt werden, daß bei allen Kulturen eine Mikrokonstitutivität⁴⁵ auftrat und daß bei entsprechender höherer Induzierbarkeit auch eine höhere Konstitutivität nachzuweisen war.

Tabelle VI
Penicillinaseaktivität⁺ von Staphylokokkenstämmen nach Wachstum
ohne und mit Penicillin-G

Stämme ⁺⁺	Nach Wachstum ohne Penicillin-G Messung der Aktivität in Sek. ⁺				Nach Wachstum mit Penicillin-G Messung der Aktivität in Sek. ⁺			
	A ⁺⁺⁺	B	C	D	A	B	C	D
1286	167,6	>200	191,0	>200	16,8	22,4	18,8	24,2
1291	>200	187,6	>200	195,2	27,6	12,8	31,0	18,4
1303	153,8	>200	177,4	>200	14,8	16,4	12,8	23,6
1342	>200	>200	160,0	>200	40,8	60,8	19,8	54,4
1343	153,8	>200	>200	127,0	16,4	18,8	20,0	17,2
1368	107,4	135,4	>200	198,6	14,0	19,8	22,2	25,8
1396	>200	>200	191,8	>200	15,2	16,8	12,2	22,4
1400	>200	164,4	>200	>200	38,6	19,4	42,6	25,2
1401	165,6	>200	>200	>200	23,4	44,8	46,4	48,8
1402	>200	186,2	>200	>200	32,4	17,8	19,8	25,2

⁺ im Photometer

⁺⁺ Kieler Stämme

⁺⁺⁺ Die Einteilung betrifft einzelne Kolonien des O,3 CY-Plattentests

4,5 Untersuchung penicillinempfindlicher Staphylokokken auf Penicillinasebildung

Fünfundzwanzig penicillinempfindliche Staphylokokkenstämme wurden im automatischen Titrator auf ihre Penicillinaseaktivität untersucht. Eine Induktion mit Penicillin-G war nicht möglich. Für die Bestimmungen im Titrator mußte der Kulturüberstand gegen 0,87%ige NaCl-Lösung dialysiert werden, um seine Pufferkapazität zu reduzieren. Die Titration erfolgte bei einem Proportionalband von 1 und einer Zeitkonstanten von 480 Sekunden. Bei allen 25 penicillinempfindlichen Staphylokokkenstämmen konnte mit Hilfe des automatischen Titrationsverfahrens, das eine hohe Spezifität zeigte, nicht die geringste Penicillinaseaktivität nachgewiesen werden.

4,6 Versuch zur Verbesserung der PNCB-Indikatormethode

Die PNCB-Indikatorlösung für den Nachweis penicillinase-positiver Staphylokokkenkulturen setzte sich aus 0,25 % N-Phenyl- α -Naphthyl-Aminoazobenzol-o-Carbonsäure gelöst in N,N-Dimethylformamid und 6 % NaOH zusammen. N-Phenyl- α -Naphthyl-Aminoazobenzol-o-Carbonsäure ist wasserunlöslich. Deshalb wurde N,N-Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet. N,N-Dimethylformamid war wegen seines großen Lösungsvermögens für anorganische und organische Verbindungen und seiner hohen Dielektrizitätskonstanten ($\epsilon = 36$) als Lösungsmittel

sehr geeignet. Für den Nachweis der enzymatisch gebildeten Penicilloinsäure mußte der saure PNCB-Indikator alkalisch gemacht werden. Dies wurde mit der Zugabe von 6 % NaOH erreicht. Wenn das N,N-Dimethylformamid als Lösungsmittel und die Natronlauge zur Erreichung eines alkalischen Milieus notwendig waren, so durfte nicht vergessen werden, daß die Staphylokokken durch diese Substanzen, die auch Zellgifte darstellten, geschädigt wurden. Deshalb wurde versucht, durch einfaches vorzeitiges Abgießen der Indikatorlösung nach verschiedenen Zeitabständen die optimale Zeit der Einwirkung der Indikatorlösung auf die Staphylokokken und ihre Penicillinaseaktivität herauszufinden. Dafür wurden 3 penicillinase-positive Staphylokokkenstämme nach dem 0,3 CY-Plattenverfahren untersucht, wobei die 1,5 ml PNCB-Indikatorlösung in den in Tabelle II angegebenen Zeiten abgegossen wurde. Das Ergebnis der Messung der Penicillinaseaktivitäten der einzelnen positiven Kolonien von den unterschiedlich behandelten 0,3 CY-Platten ist in Tabelle VII zusammengestellt. Beim Belassen der PNCB-Indikatorlösung auf den 0,3 CY-Platten bis zum Eintrocknen der gesamten 1,5 ml wurden bei allen 3 Stämmen die niedrigsten Penicillinaseaktivitäten gemessen. Beim Abgießen der PNCB-Indikatorlösung nach 5 Minuten wurden die höchsten Penicillinaseaktivitäten gemessen. Abgießen nach 10 Sekunden und 1 Minute ergab Mittelwerte (Tabelle VII).

Tabelle VII
Penicillinaseaktivitäten⁺
nach Abgießen der PNCB-Indikatorlösung

Stämme (Kiel)	Einwirken der Indikatorlösung bis			
	-	10 Sek.	1 Min.	5 Min.
1400	57,8	49,0	48,8	38,4
1401	40,1	36,2	33,8	30,6
1402	32,0	21,4	19,2	17,0

⁺In den zweiten Fraktionsröhrchen mit der photometrischen Jod-Stärke-Reaktion ermittelt

4,7 Auswertung der 0,3 CY-Plattenmethode

Um eine Aussage über die Empfindlichkeit des 0,3 CY-Plattenverfahrens für den Nachweis penicillinasebildender Staphylokokken zu erhalten, wurden 2 Stämme, die wiederholt auf 0,3 CY-Platten penicillinase-negativ waren, untersucht. Dafür kamen das Verfahren der Adsorption an Glasperlen mit anschließender photometrischer Messung und die automatische Titrationsmethode nach vorheriger Dialyse des Kulturüberstandes gegen 0,87%ige NaCl-Lösung zur Anwendung. Außerdem wurden die Stämme

mit und ohne Zusatz von Penicillin-G kultiviert. Mit diesen beiden Verfahren konnte Penicillinase im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Tabelle VIII), während das auf den 0,3 CY-Platten nicht möglich war.

Tabelle VIII
Penicillinaseaktivitäten von 2 penicillinresistenten
Stämmen mit negativer Penicillinasereaktion auf
0,3 CY-Platten

Stämme	photometrisch		automat. Titration	
	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
1279	61,4 Sek.	429,8 Sek.	196,5 E	117,5 E
1280	188,4 Sek.	470,8 Sek.	104,0 E	39,5 E

5,0 Diskussion

Die Prüfung von Keimen auf ihre Empfindlichkeit gegen Antibiotika konnte nach verschiedenen Methoden vorgenommen werden. Es wurde zwischen Röhrchen- und Plattentesten unterschieden. Der Plattentest war als Gußplatten-, Loch-, Zylinder- und Plättchentest oder nach einem von HERRMANN entwickelten Verfahren zur Anwendung gekommen⁵⁸. FRITSCH und PULVERER^{19, 20} bestimmten die Penicillinresistenz bzw. -empfindlichkeit im Platten-Reihenverdünnungstest. Bei ihren Untersuchungen⁴⁹ unterschieden die Autoren 3 Gruppen von Staphylokokkenstämmen: die penicillinempfindlichen, die mäßig resistenten und die hoch resistenten Stämme.

Für die Selektion der Staphylokokken zum Penicillinase-nachweis genügte bei diesen Untersuchungen der Tablettentest. Dieser war relativ einfach und ohne großen Aufwand auszuführen. Dabei wurde je nach Breite des Hemmhofes zwischen penicillinempfindlichen, "-teilresistenten" und "-vollresistenten" Stämmen unterschieden. Der Anteil der penicillinresistenten Staphylokokken war mit 54,8 % verhältnismäßig hoch. "Teilresistenz" (26,3 %) und "Vollresistenz" (28,5 %) waren ungefähr gleichmäßig verteilt.

Eine Aufbewahrung der penicillinresistenten Stämme sowohl für den Penicillinase-nachweis als auch für die jodometrische Messung der Aktivität auf dem Penicillin-G enthaltenden Blutschrägagar

war notwendig, um die Penicillinaseaktivität möglichst zu erhalten. Ebenso mußte eine Überimpfung der penicillinase-positiven Staphylokokkenkulturen in Abständen von 4 - 6 Wochen erfolgen, um einen Verlust der plasmidabhängigen Penicillinase zu verhindern. Hierfür eignete sich der Blutschrägagar mit einer Penicillin-G-Konzentration von 50 µg/ml. Es kam zu einer Induktion der Penicillinasebildung und damit zur ständigen Erhaltung der Aktivität. Von 686 penicillinresistenten Stämmen waren auf den 0,3 CY-Platten 61,1 % penicillinase-positiv. Dabei lag der prozentuale Anteil der "vollresistenten" Kulturen etwas höher (Tabelle IV).

Bei dem 0,3 CY-Plattenverfahren trat eine Art "Randphänomen" auf. Bei positiver Reaktion wiesen immer nur die randständigen Kolonien einen Farbumschlag von gelb nach blaurot auf. Offensichtlich hatten diese Kolonien bessere Wachstumsmöglichkeiten und damit eine stärkere Penicillinaseproduktion.

Das Problem der Indikatormethode auf den 0,3 CY-Platten bestand in der Wahl des Indikators und des Lösungsmittels. N,N-Dimethylformamid könnte als Zellgift das Wachstums- und Enzymbildungsvermögen der Staphylokokken beeinträchtigen. Außerdem war die Zeit bis zum Eintrocknen der Indikatorlösung zu berücksichtigen. Die Platten mußten dafür etwa 3 Stunden offengehalten werden. Damit war durchaus die Möglichkeit der Verunreinigung mit fremden

Keimen gegeben. Eine Abwandlung der Methode durch einfaches Abgießen der Indikatorlösung nach kürzerer Einwirkungszeit erwies sich als erfolgversprechend (Tabelle VII).

Bei den vorliegenden Untersuchungen kam es darauf an, die Verteilung der induzierbaren Staphylokokkenstämme zu prüfen. Die früher beschriebenen jodometrischen Verfahren zur Penicillinasebestimmung wurden bei gereinigten Enzympräparationen angewandt. Um aber auch eine Penicillinasebestimmung direkt im Kulturüberstand durchführen zu können, ohne daß die Jodstärkelösung mit den reduzierenden Bestandteilen des Kulturmediums reagierte, wurde nach der Methode von SCHAEGER und BLOBEL⁵³ verfahren.

Die Abtrennung der reduzierenden Bestandteile und anderer Staphylokokkensubstanzen geschah durch Adsorption der Penicillinase an Glasperlen. Die Adsorption erwies sich als ein einfaches Verfahren, zumal die Bestandteile des Kulturmediums leicht mit destilliertem Wasser von den Glasperlen abgewaschen und die Penicillinase ohne weiteres mit Ammoniumsulfat eluiert werden konnte. Hinzu kam, daß beim Auffangen des Eluats die höchste Penicillinaseaktivität immer im zweiten Fraktionsröhrchen gemessen werden konnte. Wenn auch die Methode nicht quantitativ war, so eignete sie sich ausgezeichnet für diese Reihenuntersuchungen.

Der Penicillinasenachweis mit den 0,3 CY-Platten war wesentlich unempfindlicher als der photometrische Jod-Stärke-Test. Am weitaus empfindlichsten und darüber hinaus als quantitativ erwies sich die automatische Titration. Trotz ihrer hohen Empfindlichkeit und Spezifität war die automatische Titration jedoch für Reihenuntersuchungen wegen des großen Zeitaufwandes bei niedrigen Penicillinaseaktivitäten weniger geeignet. In solchen Fällen war der Nachweis der Penicillinase durch Adsorption an Glasperlen und anschließender photometrischer Messung vorteilhafter.

Fünfundzwanzig penicillinempfindliche Staphylokokkenstämme wurden im automatischen Titrator auf Penicillinasebildung untersucht. Es sollte unter anderem geprüft werden, ob vielleicht auch penicillinempfindliche Stämme Penicillinase bilden. Es zeigte sich dabei, wie es eigentlich zu erwarten war, daß selbst mit der hochempfindlichen automatischen Titratormethode keine Penicillinaseaktivität bei penicillinempfindlichen Staphylokokken nachweisbar war. Auch hieraus könnte indirekt geschlossen werden, daß die Penicillinresistenz in der Hauptsache auf der Bildung von Penicillinase beruht. DINEEN¹³ ging sogar soweit, aufgrund seiner Untersuchungen zu sagen, daß alle penicillinresistenten Staphylokokken Penicillinase bilden. Diese Feststellung könnte durchaus zutreffen.

6,0 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung von 1251 Staphylokokkenkulturen vom Rind wurden mit Hilfe der Hemmhofmethode 686 (54,8 %) penicillinresistente Stämme gefunden. Dabei waren 357 (28,5 %) der resistenten Stämme "vollresistent" und 329 (26,3 %) "teilresistent".

Von den 686 penicillinresistenten Staphylokokkenstämmen waren nach der 0,3 CY-Plattenmethode 419 (61,1 %) penicillinase-positiv. Die penicillinase-positiven Stämme waren in verschiedenem Grade induzierbar.

Mit Hilfe des automatischen Titrators wurden auch 25 penicillinempfindliche Staphylokokkenkulturen auf Penicillinasebildung untersucht. Es konnte bei diesen Kulturen keine Penicillinaseaktivität festgestellt werden.

Von den zur Anwendung gelangten Methoden erwies sich die automatische Titration als das empfindlichste und die 0,3 CY-Plattenmethode als das am wenigsten empfindlichste Verfahren. Für Reihenuntersuchungen war jedoch die Adsorption von Penicillinase an Glasperlen mit anschließender photometrischer Messung wegen Zeitersparnis am besten geeignet.

7,0 Literaturverzeichnis

1. ABRAHAM, E.P. und CHAIN, E.:
An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.
Nature 146, 837 (1940)
2. ABRAHAM, E.P. et al.:
The earlier investigations relating to 2-pentenylpenicillin.
In: The chemistry of penicillin.
Princeton University Press, Princeton, N.J.,
10-37 (1949)
3. BARBER, M.:
Coagulase-positive staphylococci resistant to penicillin.
J. Path. Bact. 59, 373-384 (1947)
4. BARBER, M.:
Drug-resistance of staphylococci with special reference to penicillinase production.
In: Ciba Foundation Symposium on Drug-Resistance in Microorganisms.
London: J. & A. Churchill, Ltd.
262-279 (1957)
5. BARBER, M. und ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M.:
Infection by penicillin-resistant staphylococci.
Lancet 2, 641-644 (1948)

6. BARBER, M. und WHITEHEAD, J.E.M.: Bacteriophage types in penicillin-resistant staphylococcal infections.
Brit. med. J. 2, 565-569 (1949)
7. BATCHELOR, F.R.; CAMERON-WOOD, J.; CHAIN, E.B. und ROLINSON, G.N.: Studies on penicillinase produced by a strain of Staphylococcus aureus.
Proc. roy. Soc. (London) Ser. B. 158, 311-328 (1963)
8. BONDI, A. und DIETZ, C.C.: Penicillin-resistant staphylococci.
Proc. Soc. exp. Biol. 60, 55-58 (1945)
9. BONDI, A.; KORNBLUM, J. und de SAINT PHALLE, M.: Isolation of penicillin-susceptible mutants from penicillinase-producing strains of Micrococcus pyogenes.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 83, 527-530 (1953)
10. BRODAUF, H.: Die Staphylokokkenfrage in der Sicht des Eutergesundheitsdienstes.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 71, 85-90 (1964)
11. CSÁNYI, V.: A modified iodometric method of penicillinase assay.
Acta physiol. Acad. Sci. hung. 18 (4), 261-263 (1961)

12. CZEKALOWSKI, J.W.: Penicillin inactivators of bacterial origin.
J. Path. Bact. 62, 85-102 (1950)
13. DINEEN, P.: An alternate method of penicillin resistance in vivo by Staphylococcus aureus.
J. Surg. Research 4, 183-191 (1964)
14. DITTUS, G.: Untersuchungen über die Antibiotikaresistenz euterpathogener Staphylokokken.
Vet.Med.Diss. München (1969)
15. DUTHIE, E.S.: The production of penicillinase by organisms of the subtilis group.
Brit. J. exp. Path. 25, 96-100 (1944)
16. ERIKSEN, K.R. und HANSEN, D.: Observations on extracellular nature of staphylococcal penicillinase.
Acta path. microbiol. scand. 35, 169-174 (1954)
17. FAIRBROTHER, R.W.; PARKER, L. und EATON, B.R.: The stability of penicillinase-producing strains of Staphylococcus aureus.
J. gen. Microbiol. 10, 309-316 (1954)

18. FORBES, G.B.: Infection with penicillin-resistant staphylococci in hospital and general practice. Brit. med. J. 2, 569-571 (1949)
19. FRITSCHKE, D. und PULVERER, G.: Die Empfindlichkeit typisierter Staphylokokkenstämme gegen bio- und halbsynthetische Penicilline. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 191, 396-400 (1963)
20. FRITSCHKE, D. und PULVERER, G.: Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit bio- und halbsynthetischer Penicilline gegen pathogene Staphylokokken. Dtsch. med. Wschr. 89, 779-785 (1964)
21. GERONIMUS, L.H. und COHEN, S.: Induction of staphylococcal penicillinase. J. Bact. 73, 28-34 (1957)
22. GILSON, B.St.C. und PARKER, R.F.: Staphylococcal penicillinase: Characteristics of the enzyme and its distribution. J. Bact. 55, 801-812 (1948)
23. GOODALL, R.R. und DAVIES, R.: Automatic determination of penicillin in fermentation broth. Analyst. 86, 326-335 (1961)

24. GOTS, J.S.: Production of extracellular penicillin-inactivating substances associated with penicillin resistance in Staphylococcus aureus.
Proc. Soc. exp. Biol. 60, 165-168 (1945)
25. GRÜN, L.: Staphylokokken in Klinik und Praxis.
Wissenschaftliche Verlagsge-
sellschaft m.b.H., Stuttgart
(1964)
26. HARPER, G.J.: Inhibition of penicillin in
routine culture media.
Lancet 2, 569-571 (1943)
27. HAWKER, L.E.; Einführung in die Biologie
LINTON, A.H.; der Mikroorganismen.
FOLKES, B.F. und Georg Thieme Verlag, Stuttgart
CARLILE, M.J.: (1962)
28. HEPBURN, C.: Das Resistenzbild des Staphylo-
coccus aureus.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 185,
14-40 (1962)
29. HØGH, P.: Coagulase-positive, α - β -toxi-
genic udder staphylococci.
Nord. Vet. Med. 12, 588-598
(1960)

30. HOUSEWRIGHT, R.D. und HENRY, R.J.: Studies on penicillinase. I. The production, partial purification and practical application of penicillinase. J. biol. Chem. 167, 553-571 (1947)
31. KAMINSKI, Z.G.; BONDI, A.; de SAINT PHALLE, M. und MOAT, A.G.: The effect of nutritional factors on the synthesis of staphylococcal penicillinase. Arch. Biochem. Biophys. 80, 283-288 (1959)
32. KIELWEIN, G.: Beobachtungen in Vorzugsmilchbetrieben mit Staphylokokkeninfektionen. Tierärztl. Umschau 21, 343-346 (1966)
33. KIKUTH, W. und GRÜN, L.: Zur Hygiene und Bakteriologie des Staphylokokken-Hospitalismus. Dtsch. med. Wschr. 82, 549-553 (1957)
34. KIRBY, W.M.M.: Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci. Science 99, 452-453 (1944)
35. KIRBY, W.M.M.: Properties of a penicillin inactivator extracted from penicillin-resistant staphylococci. J. clin. Invest. 24, 170-174 (1945)

36. KOGHUT, M.;
POLLOCK, M.R. und
TRIDGELL, E.: Purification of penicillin-
induced penicillinase of
B. cereus. NRRL 569: A com-
parison of its properties
with those of a similarly
purified penicillinase pro-
duced spontaneously by a
constitutive strain.
Biochem. J. 62, 391-401 (1956)
37. KREBS, M.: Untersuchungen an Schlacht-
kühen über die Infektion
des Euters.
Vet. Med. Diss. Bern (1960)
38. LEDERBERG, J. und
LEDERBERG, E.: Replica plating and indirect
selection of bacterial mutants.
J. Bact. 63, 399-406 (1952)
39. LERCHE, M.: Lehrbuch der Tierärztlichen
Milchüberwachung.
Verlag Paul Parey, Berlin und
Hamburg (1966)
40. LURIA, S.E.: A test for penicillin sensi-
tivity and resistance in
staphylococcus.
Proc. Soc. exp. Biol. 61,
46-51 (1946)
41. MARTYN, G.: Staphylococci in the newborn.
Their coagulase production and
resistance to penicillin and
streptomycin.
Brit. med. J. 1, 710-712 (1949)

42. MEYER, W.: Die Staphylokokkenerkrankungen des Menschen.
Johannes Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1962)
43. MURNANE, M.: A preliminary report on the treatment of clinical and subclinical streptococcal and staphylococcal infections of the bovine udder with penicillin. Austr. Vet. J. 21, 35 (1945)
44. NOVICK, R.P.: Micro-jodometric assay for penicillinase.
Biochem. J. 83, 236-240 (1962)
45. NOVICK, R.P.: Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in Staphylococcus aureus.
J. gen. Microbiol. 33, 121-136 (1963)
46. NOVICK, R.P. und RICHMOND, M.H.: Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in Staphylococcus aureus.
J. Bact. 90, 467-480 (1965)
47. PERRET, C.J.: Jodometric assay of penicillinase.
Nature 174, 1012-1013 (1961)

48. POLLOCK, M.R.: Penicillinase adaptation in B. cereus: Adaptive enzyme formation in the absence of free substrate.
Brit. J. exp. Path. 31, 739-753 (1950)
49. PULVERER, G. und FRITSCHKE, D.: Bestehen Zusammenhänge zwischen der Penicillin-G-Resistenz, der Phaggruppenzugehörigkeit, der Antigenstruktur und dem Ferment-spektrum pathogener Staphylokokken?
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 151, 64-76 (1965)
50. PULVERER, G.; SZUKA, Ch. und PILLICH, J.: Lysogenitätsuntersuchungen an pathogenen Staphylokokken von Mensch und Tier.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 203, 203-291 (1967)
51. REHM, H.-J.: Industrielle Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1967)
52. RICHMOND, M.H.: Purification and properties of the exopenicillinase from Staphylococcus aureus.
Biochem. J. 88, 452-459 (1963)
53. SCHAEGER, W. und BLOBEL, H.: Anreicherung und Nachweis von Staphylokokken-Penicillinase.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 214, 62-67 (1970)

54. SETO, J.T. und
WILSON, J.B.:
Bacteriophage-typing of
micrococci of bovine origin.
Amer. J. Vet. Res. 19,
241-246 (1958)
55. SPINK, W.W. und
FERRIS, V.:
Penicillin-resistant staphy-
lococci: mechanisms involved
in the development of resi-
stance.
J. Clin. Invest. 26, 379-393
(1947)
56. SPINK, W.W.;
HALL, W.H. und
FERRIS, V.:
Clinical significance of
staphylococci.
J. Amer. med. Ass. 128,
555-559 (1945)
57. WENK, K.:
Leukozide Substanzen von
Staphylokokken.
Vet. Med. Diss. Giessen (1969)
58. WINKLE, S.:
Mikrobiologische und sero-
logische Diagnostik.
Gustav Fischer Verlag, Stutt-
gart (1955)
59. ZYK, N. und
CITRI, N.:
The interaction of penicilli-
nase with penicillins.
Biochem. biophys. Acta (Aust.)
159, 327-339 (1968)

Nach Abschluß meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. H. Blobel für die Themastellung, die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung sehr herzlich.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Schaeg für seine stets gewährte Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

- 1938 29. Juni geboren in Schwerin (Mecklenburg).
- 1944 - 53 Grundschule in Schwerin.
- 1953 - 56 Goethe-Oberschule I in Schwerin.
- 1956 - 60 Oranienschule in Wiesbaden.
- 1960 4. März Reifeprüfung.
- 1960 - 62 Apothekerpraktikant in Bad Schwalbach.
- 1962 27. Februar Pharmazeutische Vorprüfung
in Wiesbaden.
- 1962 - 64 Tätigkeit als Apotheker-Assistent.
- 1964 - 69 Studium der Veterinärmedizin an der
Justus Liebig-Universität Gießen.
- 1966 28. Oktober Tierärztliche Vorprüfung.
- 1968 Veterinärpraktikantenzeit bei Herrn
Dr. Hartwig in Betzdorf (Sieg).
- 1969 27. Oktober Tierärztliche Prüfung.
- 1969 10. November Tierärztliche Approbation.
- 1969 - 70 Anfertigung dieser Dissertation am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der
Justus Liebig-Universität Gießen unter
Leitung des Direktors Prof. Dr. H. Blobel.
- Seit 1970 Als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der
Justus Liebig-Universität angestellt.

Verzeichnis

1. Die Geschichte der Stadt Gießen	1
2. Die Geschichte der Stadt Grünberg	2
3. Die Geschichte der Stadt Alsfeld	3
4. Die Geschichte der Stadt Kassel	4
5. Die Geschichte der Stadt Marburg	5
6. Die Geschichte der Stadt Fulda	6
7. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	7
8. Die Geschichte der Stadt Hannover	8
9. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	9
10. Die Geschichte der Stadt Göttingen	10
11. Die Geschichte der Stadt Kassel	11
12. Die Geschichte der Stadt Marburg	12
13. Die Geschichte der Stadt Fulda	13
14. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	14
15. Die Geschichte der Stadt Hannover	15
16. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	16
17. Die Geschichte der Stadt Göttingen	17
18. Die Geschichte der Stadt Kassel	18
19. Die Geschichte der Stadt Marburg	19
20. Die Geschichte der Stadt Fulda	20
21. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	21
22. Die Geschichte der Stadt Hannover	22
23. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	23
24. Die Geschichte der Stadt Göttingen	24
25. Die Geschichte der Stadt Kassel	25
26. Die Geschichte der Stadt Marburg	26
27. Die Geschichte der Stadt Fulda	27
28. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	28
29. Die Geschichte der Stadt Hannover	29
30. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	30
31. Die Geschichte der Stadt Göttingen	31
32. Die Geschichte der Stadt Kassel	32
33. Die Geschichte der Stadt Marburg	33
34. Die Geschichte der Stadt Fulda	34
35. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	35
36. Die Geschichte der Stadt Hannover	36
37. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	37
38. Die Geschichte der Stadt Göttingen	38
39. Die Geschichte der Stadt Kassel	39
40. Die Geschichte der Stadt Marburg	40
41. Die Geschichte der Stadt Fulda	41
42. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	42
43. Die Geschichte der Stadt Hannover	43
44. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	44
45. Die Geschichte der Stadt Göttingen	45
46. Die Geschichte der Stadt Kassel	46
47. Die Geschichte der Stadt Marburg	47
48. Die Geschichte der Stadt Fulda	48
49. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	49
50. Die Geschichte der Stadt Hannover	50
51. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	51
52. Die Geschichte der Stadt Göttingen	52
53. Die Geschichte der Stadt Kassel	53
54. Die Geschichte der Stadt Marburg	54
55. Die Geschichte der Stadt Fulda	55
56. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	56
57. Die Geschichte der Stadt Hannover	57
58. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	58
59. Die Geschichte der Stadt Göttingen	59
60. Die Geschichte der Stadt Kassel	60
61. Die Geschichte der Stadt Marburg	61
62. Die Geschichte der Stadt Fulda	62
63. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	63
64. Die Geschichte der Stadt Hannover	64
65. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	65
66. Die Geschichte der Stadt Göttingen	66
67. Die Geschichte der Stadt Kassel	67
68. Die Geschichte der Stadt Marburg	68
69. Die Geschichte der Stadt Fulda	69
70. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	70
71. Die Geschichte der Stadt Hannover	71
72. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	72
73. Die Geschichte der Stadt Göttingen	73
74. Die Geschichte der Stadt Kassel	74
75. Die Geschichte der Stadt Marburg	75
76. Die Geschichte der Stadt Fulda	76
77. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	77
78. Die Geschichte der Stadt Hannover	78
79. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	79
80. Die Geschichte der Stadt Göttingen	80
81. Die Geschichte der Stadt Kassel	81
82. Die Geschichte der Stadt Marburg	82
83. Die Geschichte der Stadt Fulda	83
84. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	84
85. Die Geschichte der Stadt Hannover	85
86. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	86
87. Die Geschichte der Stadt Göttingen	87
88. Die Geschichte der Stadt Kassel	88
89. Die Geschichte der Stadt Marburg	89
90. Die Geschichte der Stadt Fulda	90
91. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	91
92. Die Geschichte der Stadt Hannover	92
93. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	93
94. Die Geschichte der Stadt Göttingen	94
95. Die Geschichte der Stadt Kassel	95
96. Die Geschichte der Stadt Marburg	96
97. Die Geschichte der Stadt Fulda	97
98. Die Geschichte der Stadt Hildesheim	98
99. Die Geschichte der Stadt Hannover	99
100. Die Geschichte der Stadt Braunschweig	100

